

【原著・基礎】

In vitro 血中濃度シミュレーションモデルを用いた *Streptococcus pneumoniae* および *Escherichia coli* 耐性化防止のための levofloxacin の至適投与法の検討

神田 裕子¹⁾・千葉めぐみ¹⁾・井上 和恵¹⁾・星野 一樹¹⁾
田中真由美²⁾・大谷 剛¹⁾・堀 誠治³⁾・戸塚 恭一⁴⁾

¹⁾ 第一三共株式会社生物医学第四研究所*

²⁾ 同 プロジェクト推進部

³⁾ 東京慈恵会医科大学薬理学

⁴⁾ 東京女子医科大学感染対策部感染症科

(平成 20 年 10 月 29 日受付・平成 20 年 12 月 2 日受理)

Levofloxacin (LVFX) の用法・用量を耐性化抑制の観点から検討する目的で、*in vitro* シミュレーションモデルを用いて本薬のヒトにおける血中濃度を再現し、*Streptococcus pneumoniae* および *Escherichia coli* に対する殺菌効果および抗菌薬作用後の耐性菌出現の有無を検討した。さらに、キノロン系抗菌薬の治療効果および耐性化抑制に相関する PK/PD パラメータである AUC/MIC および C_{max}/MIC を用いた解析を実施した。LVFX 感受性菌 ($MIC \leq 2 \mu g/mL$) を対象に検討した結果、*S. pneumoniae* では $AUC/MIC \geq 35.8$ および $C_{max}/MIC \geq 5.45$ の場合に、*E. coli* では $AUC/MIC \geq 47.3$ および $C_{max}/MIC \geq 5.6$ の場合に高い殺菌効果および LVFX の感受性低下ポピュレーションの出現が抑制された。すなわち、現在の海外通常用量である 1 日 500 mg 単回経口投与 (q.d.) の血中濃度推移では、LVFX 耐性菌の出現が抑制された。一方、国内における通常用量である 100 mg 1 日 3 回投与 (t.i.d.)、海外の尿路感染症における通常用量である 250 mg q.d.、および 250 mg 1 日 2 回投与 (b.i.d.) では MIC が $1 \sim 2 \mu g/mL$ の一部の菌株で C_{max}/MIC のターゲット値を確保できず、抗菌薬作用後に LVFX に対する感受性が $1/8 \sim 1/2$ に低下した菌のポピュレーションが出現した。これらの耐性機作を解析した結果、標的酵素のキノロン耐性決定領域のアミノ酸にキノロン耐性に関与する置換を 1 カ所獲得したこと、あるいはキノロン排出ポンプが発現亢進されたことが要因であることが示唆された。以上の成績から、LVFX 500 mg q.d. 投与は、耐性化抑制の観点から 100 mg t.i.d.、250 mg q.d. および 250 mg b.i.d. と比較して、より効果的な用法・用量であることが示唆された。

Key words: levofloxacin, *in vitro*, simulation, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*

Levofloxacin (LVFX) は、好気性のグラム陽性菌・陰性菌、偏性嫌気性菌、マイコプラズマ属、クラミジア属などに対する幅広い抗菌スペクトルを有し、呼吸器感染症、尿路感染症、皮膚感染症、腸管感染症をはじめとする各種感染症に対して有効である。

近年、キノロン系抗菌薬の使用頻度や使用量の増加とともに、本系統抗菌薬に対する耐性化が問題視されつつある。特に尿路感染症では、主要原因菌である *Escherichia coli* において、キノロン系抗菌薬耐性菌が年々増加しており¹⁾、2004 年の国内臨床分離株における LVFX 耐性率は 13%~24% に達したと報告されている²⁻⁴⁾。一方、呼吸器感染症では主要原因菌である *Streptococcus pneumoniae* および *Haemophilus influenzae* に対し、キノロン系抗菌薬は 10 年以上にわたり強い抗菌力を維持している^{1,4)}。しかしながら、キノロン系抗菌薬の処方機会

が多い高齢者では、*S. pneumoniae* のキノロン系抗菌薬耐性菌が増加しているとの報告もある⁵⁾。

近年、抗菌薬の Pharmacokinetics/Pharmacodynamics (PK/PD) に関する研究が進み、有効性および細菌の抗菌薬に対する耐性化は、その薬物動態と密接に関連していることが解明されてきた。*In vitro* 血中濃度シミュレーションモデルや免疫抑制動物の局所感染モデルにおける検討から、キノロン系抗菌薬は濃度依存的な殺菌作用を示し、治療効果に相関する主要な PK/PD パラメータは AUC/MIC であり⁶⁻⁹⁾、細菌のキノロン系抗菌薬に対する耐性化の抑制には C_{max}/MIC も相関することが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。そのため、感染症治療の適正化および抗菌薬耐性菌発現抑制の面から、対象疾患、抗菌薬感受性動向も含め、抗菌薬の用法・用量の至適化が求められている。

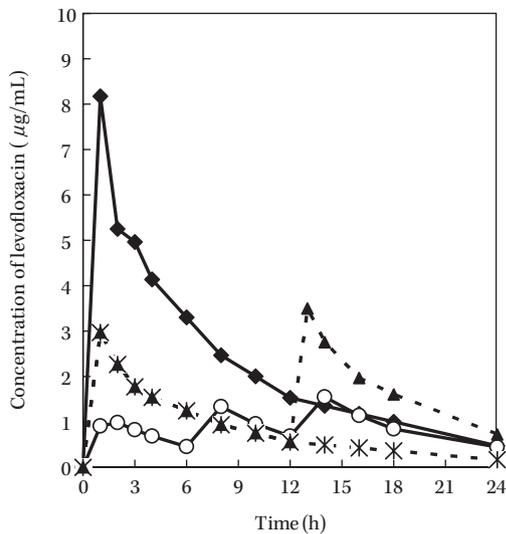


Fig. 1. Simulated blood concentration of levofloxacin in an *in vitro* pharmacokinetic model.

Open circles, 100 mg t.i.d.; closed diamonds, 500 mg q.d.; dotted line with asterisks, 250 mg q.d.; dotted line with closed triangles, 250 mg b.i.d.

現在LVFX経口薬の国内における通常用法・用量は、1回100 mg 1日2~3回(t.i.d.)であるが、海外における通常用法・用量は、主に500 mg 1日1回(q.d.)が用いられている。本研究は、LVFXの用法・用量を本薬剤耐性化抑制の観点から解析することを目的として、*in vitro* ヒト血中濃度シミュレーションモデルにおける呼吸器感染症および尿路感染症の代表原因菌に対する殺菌効果およびLVFX耐性菌出現の有無を検討したものである。なお、用法・用量としては、国内における通常用量：100 mg t.i.d.、海外における通常用量：500 mg q.d.、尿路感染症における海外通常用量：250 mg q.d.、および250 mg 1日2回(b.i.d.)投与を想定し、検討した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株と抗菌薬感受性

S. pneumoniae は、標的酵素のキノロン耐性決定領域(QRDR)にキノロン耐性に主にかかわるアミノ酸置換を有さないLVFX感受性の臨床分離株EG00336, EG00110, EG00245, EG00289, EG00453, EG00179およびEG00471の計7株を用いた。なお、EG00245およびEG00179株は、reserpine (10 µg/mL)併用時に ciprofloxacin (CPF)の抗菌活性が非併用時の4倍に上昇したため、薬剤排出ポンプ高発現株であると考えられた。*E. coli* は、LVFX感受性の臨床分離株GK00750, GK00459, GK00052, GK00496およびGK00142の計5株を用いた。標準法のMICは2倍段階希釈のため、より詳細なMICの把握を目的としてClinical Laboratory Standard Institute (CLSI)微量液体希釈法を一部改変し、これらの菌株に対するLVFXの詳細最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。すなわち、抗菌薬は1.14倍段階希釈し、3回のMIC測定の平均を詳細MICとした。

2. 使用抗菌薬

LVFXおよびCPFは第一三共株式会社合成品を、ReserpineおよびPhe-Arg-β-naphthylamide (PAβN)はSigma Aldrich Japanより購入して用いた。各抗菌薬の濃度は活性本体の値として表示した。

3. *In vitro* 血中濃度シミュレーションシステムを用いた殺菌効果の検討

1) シミュレーションモデルの設定

血中濃度推移の再現は、オートシミュレーションシステム(PASS400, 大日本精機, 京都)を用いて行った。本実験では、ヒト経口投与時のモデルとして、LVFX 100 mg t.i.d. (6時間間隔) 経口投与した場合、LVFX 250 mg q.d. 経口投与した場合、LVFX 250 mgを1日2回(b.i.d., 12時間間隔) 経口投与した場合、ならびにLVFX 500 mg q.d. 経口投与した場合の血中濃度推移を国内臨床薬理試験における単回投与時の血中濃度推移に基づき設定した(Fig. 1)。各モデルの濃度推移は血中total濃度推移を再現し、濃度はHPLC法により確認した。

2) 殺菌作用の検討

S. pneumoniae では、35°Cで一夜培養した菌株を4時間振盪培養し、2%馬溶血液(株式会社日本バイオテスト研究所, 東京)添加Cation adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB; Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)にて $10^6 \sim 10^7$ CFU/mLになるように適宜希釈後、シミュレーション開始時の菌液とした。シミュレーション開始後24時間まで適宜菌液をスキムミルク溶液(終濃度3%)中にサンプリングし、生理食塩水にて適宜希釈後、その一定量を5%綿羊脱繊維血液添加Heart infusion agar (HIA; 栄研化学, 東京)平板上に塗布し、35°Cで一夜培養後、寒天平板上のコロニー数を計測し生菌数を算出した。なお、検出限界は20 CFU/mLとした。

E. coli では、35°Cで一夜培養した菌株を1時間振盪培養し、CAMHBにて $10^6 \sim 10^7$ CFU/mLになるように適宜希釈後、シミュレーション開始時の菌液とした。シミュレーション開始後24時間まで適宜菌液をサンプリングし、生理食塩水にて適宜希釈後、その一定量をMueller-Hinton agar (MHA; Becton Dickinson and Company)平板上に塗布し、35°Cで一夜培養後、寒天平板上のコロニー数を計測し生菌数を算出した。なお、検出限界は10 CFU/mLとした。

4. ポピュレーション解析

シミュレーション開始24時間後の菌液を適宜希釈後、抗菌薬非含有および1/4~16 MIC(最終濃度)のLVFX含有MHA (*S. pneumoniae*の場合は5%綿羊脱繊維血液加MHA)平板に塗布した。35°Cで48時間培養後、寒天平板上のコロニー数を計測した。シミュレーション開始前の菌株についても同様の試験を実施し、抗菌薬作用前後のLVFX感受性ポピュレーションと比較し、抗菌薬感受性の変化を検討した。なお、*E. coli* および *S. pneumoniae*

の検出限界は、それぞれ 20 および 40 CFU/mL とした。

5. 抗菌薬感受性低下株の解析

ポピュレーション解析の結果、抗菌薬作用 24 時間後の菌液にシミュレーション開始前の菌と比較して LVFX に低感受性化したポピュレーションが確認された場合は、以下の操作を実施した。抗菌薬作用 24 時間後の菌液を塗布した抗菌薬非含有平板上のコロニーを適宜、抗菌薬非含有（マスタープレート）および 1/2~16 MIC（最終濃度）の LVFX 含有 MHA (*S. pneumoniae* の場合は 5% 綿羊脱繊維血液加 MHA) 平板にレプリカした。抗菌薬作用前の菌と比較して LVFX に対する感受性が低下したもののなかから無作為に抽出し、相当するマスタープレート上のコロニーについて、薬剤感受性測定、標的酵素の QRDR 部位の塩基配列解析および薬剤排出ポンプ発現の有無について検討した。

1) 薬剤感受性測定

LVFX の MIC を、CLSI の MIC 測定法に準じた寒天平板希釈法により測定した。

2) 標的酵素の QRDR 部位の塩基配列解析

標的酵素の各遺伝子 (*gyrA*, *gyrB*, *parC* および *parE*) の QRDR 部位を Ex Taq DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社, 滋賀) および GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster city, CA., USA) を用いて、PCR 法により増幅し、3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems/HITACHI) を用いて塩基配列を決定し、アミノ酸置換を解析した。使用プライマーは以下のとおりである。

(1) *S. pneumoniae*

gyrA: 5'-GTCAATCTGACAAAGGAGATGAAGG-3' (塩基 25-49) および

5'-CAATCTCTGTACGAGAACGTAGGAC-3' (塩基 739-715)

gyrB: 5'-TTACCAATCGCCTCTTCAGTGAAGC-3' (塩基 1070-1094) および

5'-CTTCCAACCTTGACACCATAGATTGG-3' (塩基 1646-1621)

parC:

5'-ATGTCTAACATTCAAAACATGTCCCTG-3'

(塩基 10-36) および

5'-AAACTGCAGCATCTATGACCTCAGC-3' (塩基 583-559)

parE: 5'-CAGTTGTGGATGGAATAGTGGCTG-3' (塩基 1061-1084) および

5'-GGACATCTTGTAAGAGGTGGGAG-3' (塩基 1638-1615)

なお、キノロン耐性にかかわるアミノ酸置換 (ParC 79 位および 83 位, ParE 435 位および 474 位, GyrA 81 位および 85 位, GyrB 435 位および 474 位) について確認した。

(2) *E. coli*

gyrA: 5'-GAGCTCCTATCTGGATTAT-3' (塩基 54-72) および

5'-GAGCGCGGATATACACCTT-3' (塩基 733-715)

gyrB: 5'-GTGAAATGACCCGCCGTA-3' (塩基 1166-1185) および

5'-CGTCGCGTTGTACTCAGATA-3' (塩基 1770-1751)

parC: 5'-GACCGTGCGTTGCCGTTTAT-3' (塩基 82-101) および

5'-GTGGTAGCGAAGAGGTGGTT-3' (塩基 956-937)

parE: 5'-GCCCAGCGCCGTATGCGTGC-3' (塩基 1126-1145) および

5'-GTTTCGGATCAAGCGTGGTTT-3' (塩基 1746-1727)

なお、キノロン耐性にかかわるアミノ酸置換 (GyrA 83 位および 87 位, GyrB 426 位, ParC 80 位および 84 位) について確認した。

3) 薬剤排出ポンプ発現に関する解析

(1) *S. pneumoniae*

Reserpine 10 μ g/mL 添加および非添加時の CPFX の MIC を寒天平板希釈法にて測定した。非添加時/添加時の MIC 比 (Ratio) が 4 以上の株を薬剤排出ポンプ高発現株と判定した。

(2) *E. coli*

PA β N 100 μ g/mL 添加および非添加時の LVFX の MIC を寒天平板希釈法にて測定した。非添加時/添加時の MIC 比 (Ratio) が 4 以上の株を薬剤排出ポンプ高発現株と判定した。

II. 結 果

1. *In vitro* 血中濃度シミュレーションシステムを用いた LVFX の殺菌作用およびシミュレーション開始 24 時間後の菌液のポピュレーション解析

1) *S. pneumoniae*

LVFX 100 mg t.i.d. 投与および 500 mg q.d. 投与時のヒト血中濃度推移をシミュレートした際の各供試菌株における生菌数変化を Fig. 2 に、シミュレーション開始 24 時間後の菌液のポピュレーション解析結果を Fig. 3 に示す。いずれの菌株においても control の生菌数は培養開始後に $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL まで増加し、その後徐々に減少したが再び増殖を開始した。

LVFX 100 mg t.i.d. モデルでは、*S. pneumoniae* EG00336 (LVFX の MIC: 0.5 μ g/mL) においてシミュレーション開始後に殺菌作用が認められ、生菌数は検出限界近くまで減少し、その後の再増殖はほとんど認められなかった (Fig. 2A)。本菌株では、抗菌薬作用によりシミュレーション開始前と比較して LVFX に対する感受性が低下した菌のポピュレーションは確認されなかった (Fig. 3A)。*S. pneumoniae* EG00110, EG00245 および EG00289

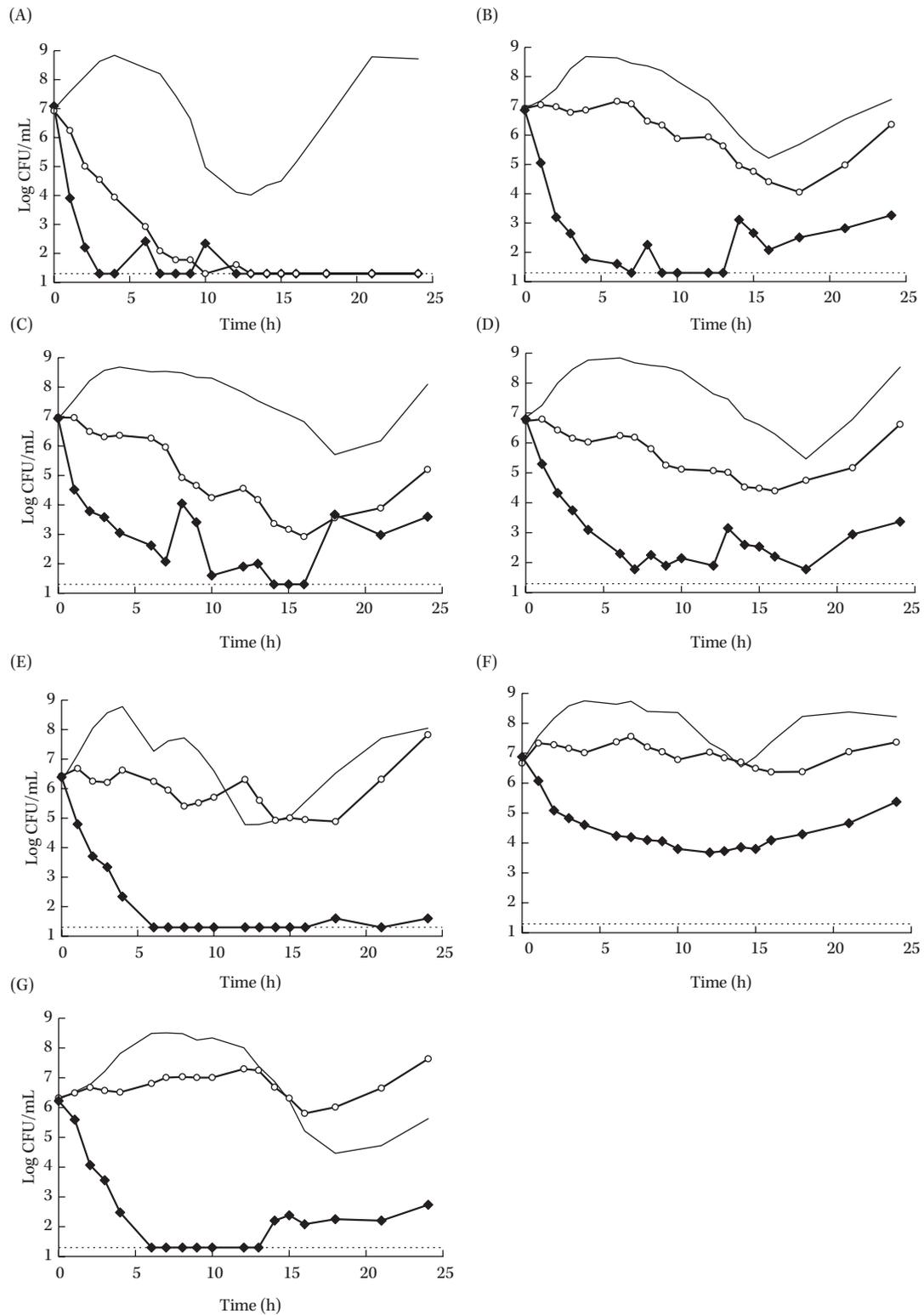


Fig. 2. Bactericidal activity of levofloxacin against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacokinetic model.

(A) *S. pneumoniae* EG00336, (B) *S. pneumoniae* EG00110, (C) *S. pneumoniae* EG00245, (D) *S. pneumoniae* EG00289, (E) *S. pneumoniae* EG00453, (F) *S. pneumoniae* EG00179, (G) *S. pneumoniae* EG00471. Open circles, 100 mg t.i.d.; closed diamonds, 500 mg q.d.; solid line, growth control, dotted line; detection limit.

(LVFXのMIC: $1.1 \mu\text{g/mL}$)では、生菌数は抗菌薬作用により初期菌数の約 $1/10^2 \sim 1/10^4$ に減少するものの、そ

の後24時間までに菌は初期菌数を超えない程度に再増殖した (Fig. 2B, C, D)。これらの株においてはシミュ

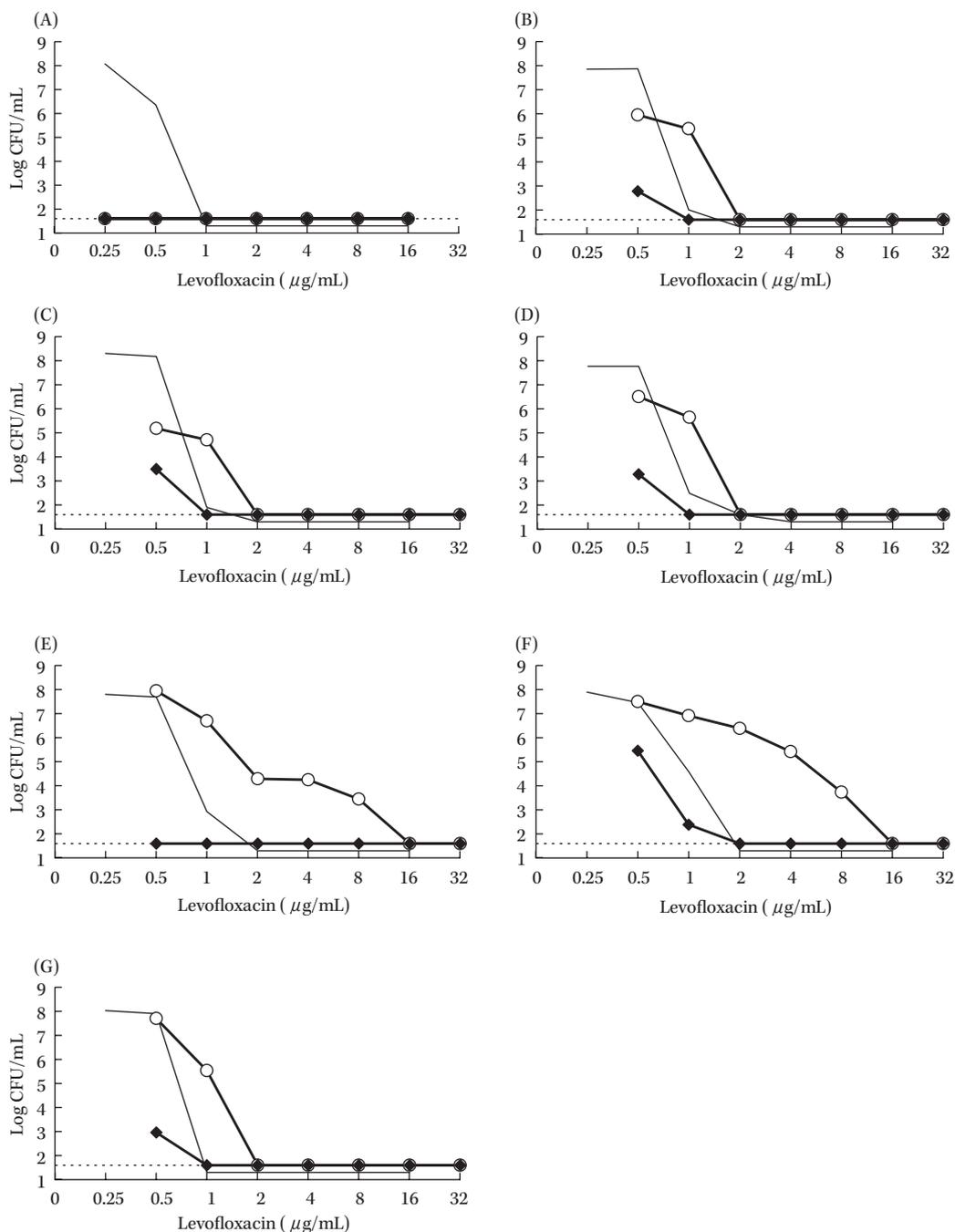


Fig. 3. Frequency of resistant population in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* after simulating blood concentration of levofloxacin.

(A) *S. pneumoniae* EG00336, (B) *S. pneumoniae* EG00110, (C) *S. pneumoniae* EG00245, (D) *S. pneumoniae* EG00289, (E) *S. pneumoniae* EG00453, (F) *S. pneumoniae* EG00179, (G) *S. pneumoniae* EG00471. Open circles, 100 mg t.i.d.; closed diamonds, 500 mg q.d.; solid line, control with no drug treatment, dotted line; detection limit.

レーション開始前と比較してLVFXに対する感受性が1/2に低下した菌のポピュレーションが確認された (Fig. 3B, C, D)。一方, *S. pneumoniae* EG00453 (LVFXのMIC; 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), EG00179 (LVFXの詳細MIC; 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) およびEG00471 (LVFXのMIC; 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) では初期菌数を維持する静菌的な作用しか認められず,

24時間後の菌数は初期菌数を上回った (Fig. 2E, F, G)。これらの株においてはLVFXに対する感受性が抗菌薬作用前と比較して1/2~1/8に低下した菌のポピュレーションが確認された (Fig. 3E, F, G)。

一方, LVFX 500 mg q.d.モデルでは, 供試した7株すべてにおいて強い殺菌作用が認められ, 抗菌薬作用7時

Table 1. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters and bactericidal effect of levofloxacin in 100 mg t.i.d. and 500 mg q.d. models in *Streptococcus pneumoniae*

Strain No.	Detailed MIC ^a ($\mu\text{g/mL}$)	Simulation model	AUC/MIC	C _{max} /MIC	Log of CFU/mL at 0 h	Log of CFU/mL at 24 h	Degree in population analysis ^b
EG00336	0.5	100 mg t.i.d.	42.9	3.10	6.92	1.30	1
		500 mg q.d.	107	16.3	7.08	1.30	1
EG00110	1.1	100 mg t.i.d.	19.5	1.41	6.91	6.37	2
		500 mg q.d.	48.8	7.43	6.85	3.26	1
EG00245	1.1	100 mg t.i.d.	19.5	1.41	6.97	5.20	2
		500 mg q.d.	48.8	7.43	6.94	3.60	1
EG00289	1.1	100 mg t.i.d.	19.5	1.41	6.74	6.62	2
		500 mg q.d.	48.8	7.43	6.80	3.37	1
EG00453	1.3	100 mg t.i.d.	16.5	1.19	6.43	7.83	8
		500 mg q.d.	41.3	6.28	6.39	1.60	1
EG00179	1.5	100 mg t.i.d.	14.3	1.03	6.67	7.37	8
		500 mg q.d.	35.8	5.45	6.88	5.38	1
EG00471	1.5	100 mg t.i.d.	14.3	1.03	6.32	7.64	2
		500 mg q.d.	35.8	5.45	6.23	2.73	1

^a: MIC was tested 3 times and the average calculated.

^b: Degree of the susceptibility reduction to levofloxacin at 24 h.

間までに生菌数は約 $1/10^3 \sim 1/10^6$ に減少した。その後、EG00110, EG00245, EG00289, EG00179 および EG00471 では再増殖が認められたものの、24 時間後の生菌数は初期菌数を下回った。本モデルでは、すべての株において LVFX に対する感受性が低下した菌のポピュレーションは確認されなかった。

Table 1 に供試株における検討結果から算出した各種ファーマコダイナミック (PD) パラメータおよび殺菌効果パラメータを示した。*S. pneumoniae* では、AUC/MIC が 35.8 以上および C_{\max}/MIC が 5.45 以上の場合に LVFX 感受性低下菌の出現は認められなかった。

2) *E. coli*

LVFX 100 mg t.i.d. 投与, 250 mg q.d. 投与, 250 mg b.i.d. 投与 (*E. coli* GK00052, GK00496 および GK00142 のみ実施) および 500 mg q.d. 投与時のヒト血中濃度推移をシミュレートした際の各供試菌株における生菌数変化を Fig. 4 に、シミュレーション開始 24 時間後の菌液のポピュレーション解析結果を Fig. 5 に示す。いずれの菌株においても control の生菌数は培養開始後に 10^9 CFU/mL まで増加し、定常状態に達した。

LVFX 100 mg t.i.d. モデルでは、*E. coli* GK00750 (LVFX の MIC ; $0.38 \mu\text{g/mL}$) においてはシミュレーション開始直後に殺菌作用が認められ、生菌数は検出限界付近にまで減少したが、その後再増殖した (Fig. 4A)。本菌株においては、抗菌薬作用によりシミュレーション開始前と比較して LVFX に対する感受性が $1/2$ に低下した菌のポピュレーションが確認された (Fig. 5A)。*E. coli* GK00459 (LVFX の MIC ; $0.78 \mu\text{g/mL}$)、GK00052 (LVFX の MIC ; $0.84 \mu\text{g/mL}$) および GK00496 (LVFX の MIC ; $1.1 \mu\text{g/mL}$) では、生菌数は抗菌薬作用 4~6 時間後に初期菌数の約 $1/10^2 \sim 1/10^3$ に減少するものの、その後初期菌数

を上回るまでに再増殖した (Fig. 4B, C, D)。これらの菌株においてはシミュレーション開始前と比較して LVFX に対する感受性が $1/2 \sim 1/8$ に低下した菌のポピュレーションが確認された (Fig. 5B, C, D)。一方、*E. coli* GK00142 (LVFX の MIC ; $1.52 \mu\text{g/mL}$) では殺菌作用は認められず、コントロールと同様の菌の増殖が確認された (Fig. 4E)。本株においては LVFX に対する感受性が低下した菌のポピュレーションは確認されなかった (Fig. 5E)。

LVFX 250 mg q.d. モデルでは、*E. coli* GK00750 および GK00459 においてはシミュレーション開始直後に殺菌作用が認められ、生菌数は検出限界付近にまで減少したが、その後再増殖した (Fig. 4A, B)。これらの菌株においては、抗菌薬作用によりシミュレーション開始前と比較して LVFX に対する感受性が低下した菌のポピュレーションは確認されなかった (Fig. 5A, B)。*E. coli* GK00052, GK00496 および GK00142 では、抗菌薬作用により生菌数は初期菌数の約 $1/10^2 \sim 1/10^3$ に減少するものの、その後初期菌数を上回るまでに再増殖した (Fig. 4 C, D, E)。これらの株においてはシミュレーション開始前と比較して LVFX に対する感受性が $1/2 \sim 1/8$ に低下した菌のポピュレーションが確認された (Fig. 5C, D, E)。

LVFX 250 mg b.i.d. モデルでは、検討を実施した *E. coli* GK00052, GK00496 および GK00142 において、生菌数は抗菌薬作用後に初期菌数の約 $1/10^2 \sim 1/10^3$ に減少するものの、その後初期菌数を上回るまでに再増殖した (Fig. 4C, D, E)。これらの株においてはシミュレーション開始前と比較して LVFX に対する感受性が $1/2 \sim 1/8$ に低下した菌のポピュレーションが確認された (Fig. 5C, D, E)。

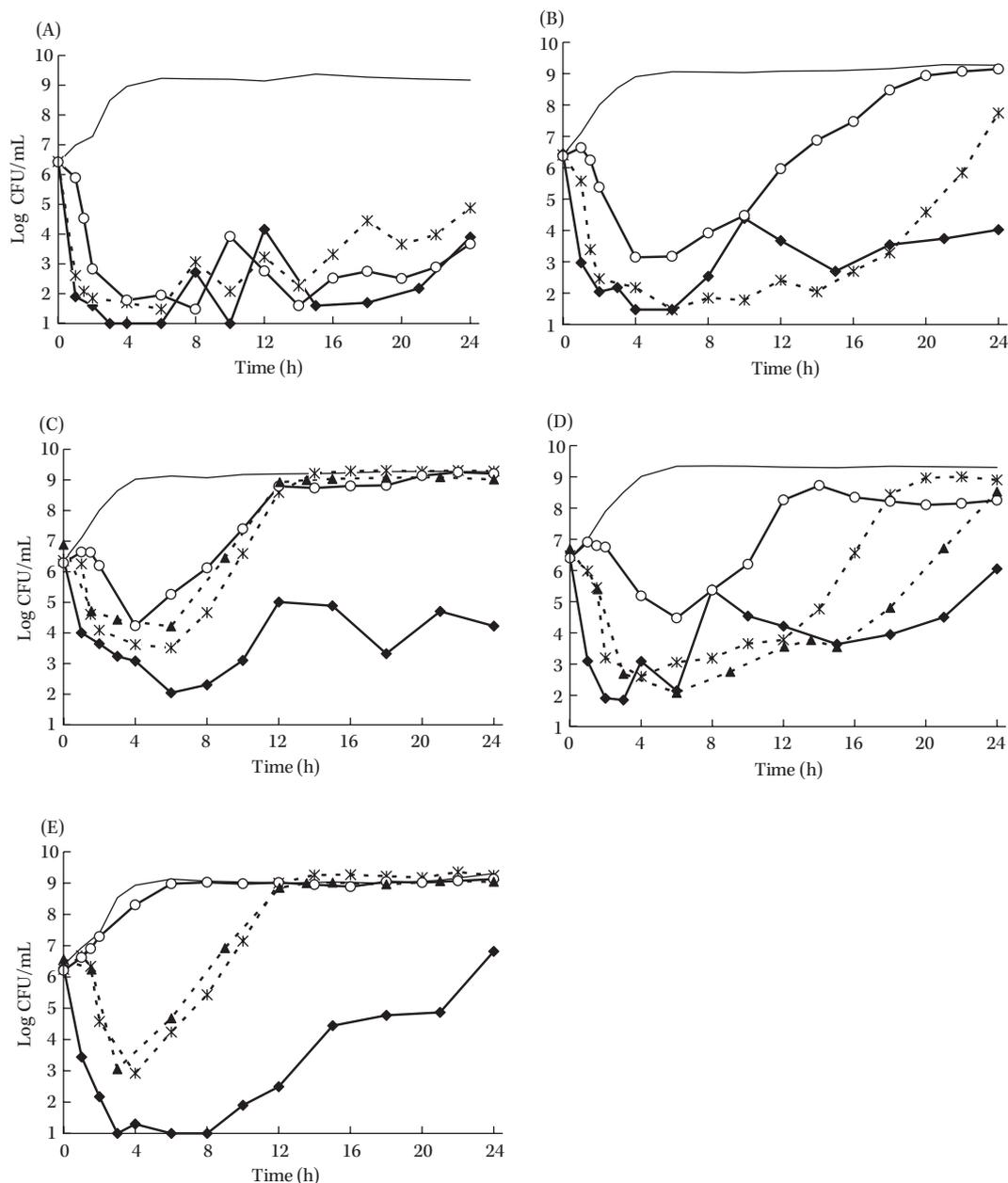


Fig. 4. Bactericidal activity of levofloxacin against clinical isolates of *Escherichia coli* in an *in vitro* pharmacokinetic model.

(A) *E. coli* GK00750, (B) *E. coli* GK00459, (C) *E. coli* GK00052, (D) *E. coli* GK00496, (E) *E. coli* GK00142. Open circles, 100 mg t.i.d.; dotted line with asterisks, 250 mg q.d.; dotted line with closed triangles, 250 mg b.i.d.; closed diamonds, 500 mg q.d.; solid line, growth control.

一方、LVFX 500 mg q.d.モデルでは、供試した8株すべてにおいて殺菌作用が認められ、生菌数は約 $1/10^3 \sim 1/10^5$ に減少した。菌はその後再増殖したものの GK00142 以外では24時間後の菌量は初期菌数を下回った (Fig. 4 A~E)。ポピュレーション解析の結果、抗菌薬作用前後でLVFX感受性に変動は認められず、LVFX感受性低下菌の出現は認められなかった (Fig. 5A~E)。

Table 2 に供試株の検討結果から算出した各種PDパラメータおよび殺菌効果パラメータを示した。今回の検

討の結果、*E. coli* では、AUC/MIC が47.3以上および C_{max}/MIC が5.6以上の場合に、LVFX感受性低下菌の出現は認められなかった。

2. シミュレーション開始24時間後の菌液の解析

1) *S. pneumoniae*

LVFX 100 mg t.i.d.作用後の *S. pneumoniae* EG00110, EG00245, EG00289, EG00453 および EG00179 で出現したLVFX低感受性化コロニーにおける低感受性化機序の解析結果をTable 3に示した。

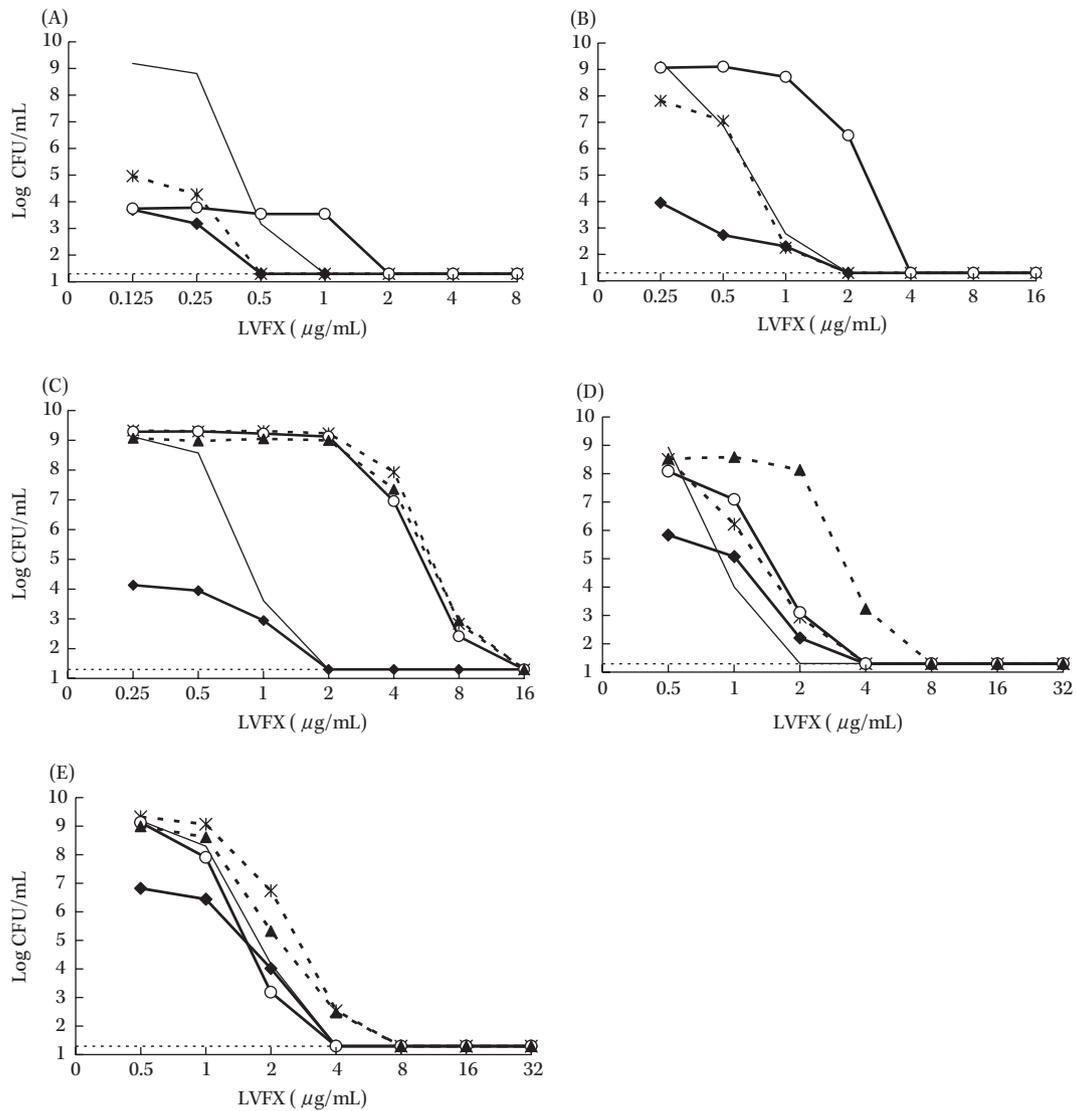


Fig. 5. Frequency of resistant population in clinical isolates of *Escherichia coli* after simulating blood concentration of levofloxacin.

(A) *E. coli* GK00750, (B) *E. coli* GK00459, (C) *E. coli* GK00052, (D) *E. coli* GK00496, (E) *E. coli* GK00142. Open circles, 100 mg t.i.d.; dotted line with asterisks, 250 mg q.d.; dotted line with closed triangles, 250 mg b.i.d.; closed diamonds, 500 mg q.d.; solid line, control with no drug treatment, dotted line; detection limit.

(1) 標的酵素の QRDR 部位のアミノ酸置換と抗菌薬感受性

LVFX 100 mg t.i.d.作用後の *S. pneumoniae* EG00110, EG00245, EG00289, EG00453 および EG00179 で出現した LVFX 低感受性化コロニーにおいて、標的酵素の QRDR にアミノ酸置換を 1 カ所獲得 [ParC (Ser79→Tyr, Phe または Asp83→Asn, Tyr), ParE (Asp435→Asn) あるいは GyrA (Ser81→Phe)] したことにより、LVFX の MIC が 2 倍に上昇した変異株が確認された。なお、*S. pneumoniae* EG00471 株でも抗菌薬作用後に LVFX に対する感受性が 1/2 に低下した菌のポピュレーションが確認されたが、QRDR のアミノ酸置換は確認されなかった (data not shown)。

(2) 薬剤排出ポンプ発現

薬剤排出ポンプの発現株であることが示唆された *S. pneumoniae* EG00245 および EG00179 では、LVFX 100 mg t.i.d.作用後に LVFX の MIC が 4 あるいは 8 倍に上昇した耐性化コロニーが確認された。これらの株に対する CPFVX の MIC は reserpine を併用することにより 1/16 に低下しており、抗菌薬作用前の株と比較して reserpine の併用効果が 4 倍に増強されたことから、抗菌薬作用によりさらに薬剤排出ポンプの発現が亢進されたことが示唆された。*S. pneumoniae* EG00110, EG00289 および EG00453 では、抗菌薬作用後にポンプ発現を亢進した株は確認されなかった。なお、*S. pneumoniae* EG00471 株でも抗菌薬作用後に LVFX に対する感受性が 1/2 に低下した菌のポピュレーションが確認されたが、ポンプ発現

Table 2. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters and bactericidal effect of levofloxacin in 100 mg t.i.d., 250 mg q.d., 250 mg b.i.d., and 500 mg q.d. models in *Escherichia coli*

Strain No.	Detailed MIC ^a ($\mu\text{g/mL}$)	Simulation model	AUC/MIC	Cmax/MIC	Log of CFU/mL at 0 h	Log of CFU/mL at 24 h	Degree in population analysis ^b
GK00750	0.38	100 mg t.i.d.	56.6	4.2	6.42	3.67	2
		250 mg q.d.	52.4	8.2	6.44	4.88	1
		500 mg q.d.	136.8	16.3	6.45	3.90	1
GK00459	0.78	100 mg t.i.d.	27.6	2.1	6.37	9.15	2
		250 mg q.d.	25.5	4.0	6.41	7.74	1
		500 mg q.d.	66.7	7.9	6.44	4.02	1
GK00052	0.84	100 mg t.i.d.	25.6	1.9	6.29	9.20	8
		250 mg q.d.	23.7	3.7	6.36	9.29	8
		250 mg b.i.d.	43.1	4.2	6.88	9.02	8
		500 mg q.d.	61.9	7.4	6.40	4.23	1
GK00496	1.10	100 mg t.i.d.	19.5	1.5	6.40	8.25	2
		250 mg q.d.	18.1	2.8	6.48	8.90	2
		250 mg b.i.d.	32.9	3.2	6.70	8.53	4
		500 mg q.d.	47.3	5.6	6.41	6.05	1
GK00142	1.52	100 mg t.i.d.	14.1	1.1	6.21	9.13	1
		250 mg q.d.	13.1	2.0	6.25	9.25	2
		250 mg b.i.d.	23.8	2.3	6.56	9.05	2
		500 mg q.d.	34.2	4.1	6.29	6.82	1

^a: MIC was tested 3 times and the average was calculated.^b: Degree of the susceptibility reduction to levofloxacin at 24 h.

Table 3. MICs with or without reserpine and amino acid substitutions in the QRDR after treatment with levofloxacin 100 mg t.i.d. model

Isolate	Amino acid substitution			MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Ratio ^b
	ParC	ParE	GyrA	Levofloxacin	Ciprofloxacin		
					Alone	+ Reserpine	
EG00110	None	None	None	1	2	1	2
LVFX/EG00110-1 ^a	Ser79 → Tyr	None	None	2	4	2	2
LVFX/EG00110-2	None	Asp435 → Asn	None	2	4	2	2
EG00245	None	None	None	1	2	0.5	4
LVFX/EG00245-1	None	None	None	4	16	1	16
LVFX/EG00245-2	Asp83 → Asn	None	None	2	8	2	4
LVFX/EG00245-3	None	Asp435 → Asn	None	2	4	1	4
EG00289	None	None	None	1	1	0.5	2
LVFX/EG00289-1	Ser79 → Tyr	None	None	2	4	2	2
LVFX/EG00289-2	Asp83 → Tyr	None	None	2	4	2	2
LVFX/EG00289-3	None	None	Ser81 → Phe	2	2	1	2
EG00453	None	None	None	1	2	1	2
LVFX/EG00453-1	Asp83 → Tyr	None	None	2	4	2	2
LVFX/EG00453-2	Asp83 → Asn	None	None	2	4	2	2
EG00179	None	None	None	1	4	1	4
LVFX/EG00179-1	None	None	None	8	32	1	32
LVFX/EG00179-2	Ser79 → Phe	None	None	2	8	2	4

^a: LVFX, isolate after treatment with levofloxacin 100 mg t.i.d. model.^b: Values listed are reduction (n-fold) in MIC of ciprofloxacin with addition of reserpine (10 $\mu\text{g/mL}$).

亢進は確認されなかった (data not shown)。

2) *E. coli*

LVFX 100 mg t.i.d.あるいは250 mg q.d.作用後の *E. coli* GK00459, GK00052, GK00496 および GK00142 で

出現した LVFX 低感受性化コロニーにおける低感受性化機序の解析結果を Table 4 に示した。

Table 4. MICs with or without PA β N and amino acid substitutions in the QRDR after treatment with levofloxacin 100 mg t.i.d. model or 250 mg q.d. model

Isolate	LVFX simulation model	Amino acid substitution		MIC (μ g/mL)		Ratio ^b
		GyrA	ParC	Levofloxacin Alone	+ PA β N	
GK00459	— ^a	Ser83 \rightarrow Leu	Glu84 \rightarrow Gly	1	0.25	4
LVFX/GK00459	100 mg t.i.d.	Ser83 \rightarrow Leu	Glu84 \rightarrow Gly	4	0.25	16
GK00052	—	Ser83 \rightarrow Leu	Ser80 \rightarrow Ile	1	0.25	4
LVFX/GK00052-1	100 mg t.i.d.	Ser83 \rightarrow Leu	Ser80 \rightarrow Ile	8	2	4
LVFX/GK00052-2	250 mg q.d.	Asp87 \rightarrow Gly Ser83 \rightarrow Leu Asp87 \rightarrow Gly	Ser80 \rightarrow Ile	8	2	4
GK00496	—	Ser83 \rightarrow Leu	None	1	0.125	8
LVFX/GK00496-1	100 mg t.i.d.	Ser83 \rightarrow Leu	None	2	0.125	16
LVFX/GK00496-2	250 mg q.d.	Ser83 \rightarrow Leu	None	2	0.125	16
GK00142	—	Ser83 \rightarrow Leu	None	2	0.25	8
LVFX/GK00142	250 mg q.d.	Ser83 \rightarrow Leu	None	4	0.25	16

^a: No treatment, ^b: Values listed are reduction (n-fold) in MIC of levofloxacin with addition of Phe-Arg- β -naphthylamide (PA β N, 100 μ g/mL).

(1) 標的酵素の QRDR 部位のアミノ酸置換と抗菌薬感受性

LVFX 100 mg t.i.d.および 250 mg q.d.作用後の *E. coli* GK00052 で出現した耐性化コロニーにおいて, GyrA の QRDR にアミノ酸置換を 1 カ所獲得 (Asp87 \rightarrow Gly) したことにより, LVFX の MIC が 8 倍に上昇した変異株が確認された。

(2) 薬剤排出ポンプ発現

E. coli GK00459 では, LVFX 100 mg t.i.d.作用後に LVFX の MIC が 4 倍に上昇した低感受性化コロニーが確認された。また, *E. coli* GK00496 では LVFX 100 mg t.i.d.および 250 mg q.d.作用後に, *E. coli* GK00142 では LVFX 250 mg q.d.作用後に LVFX の MIC が 2 倍に上昇した低感受性化コロニーが確認された。これらの株に対する LVFX の MIC は PA β N を併用することにより, すべて 1/16 に低下した。また, これらの株では PA β N の併用効果が抗菌薬作用前の株と比較して 2~4 倍に増強されたことから, 抗菌薬作用によりさらに薬剤排出ポンプの発現が亢進されたことが示唆された。*E. coli* GK00052 では, 抗菌薬作用後にポンプ発現を亢進した株は確認されなかった。なお, *E. coli* GK00750 株では LVFX 100 mg t.i.d.作用後に LVFX に対する感受性が 1/2 に低下した菌のポピュレーションが確認されたが, 薬剤排出ポンプのさらなる発現亢進は確認されなかった (data not shown)。

III. 考 察

キノロン系抗菌薬に関しては, *in vitro* 血中濃度シミュレーションモデルや免疫抑制動物の局所感染モデルにおける検討およびヒトでの臨床試験の成績から, 治療効果に相関する主要な PK/PD パラメータは AUC/MIC であり⁶⁻⁹⁾, 一方, 細菌のキノロン系抗菌薬に対する耐性化の

抑制には C_{max}/MIC も相関することが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。今回, LVFX の用法・用量を耐性化抑制の観点から検討する目的で, *in vitro* シミュレーションモデルを用いて本薬のヒトにおける血中濃度を再現し, LVFX 感受性の *S. pneumoniae* および *E. coli* に対する殺菌効果および抗菌薬作用後の耐性菌出現の有無を検討した。その結果, *S. pneumoniae* では AUC/MIC が 35.8 以上および C_{max}/MIC が 5.45 以上の場合に高い殺菌効果および LVFX の感受性低下ポピュレーションの出現抑制が確認された。*S. pneumoniae* に関しては, *in vitro* シミュレーションモデルを用いた種々の検討結果が報告されているが, ターゲット値はキノロン系抗菌薬により異なることとされている^{13,14)}。LVFX に関する研究では, Lister ら, Lacy ら, および Zhanell らは, AUC_{0-24h}/MIC が 30~35 以上の場合に LVFX の治療効果が確認されると報告している^{6,14,15)}。また, Madaras-Kelly らは, C_{max}/MIC が 5 以上では *S. pneumoniae* における LVFX への耐性化は認められなかったことを¹⁰⁾, Coyle らは $AUC_{0-24h}/MIC \leq 31.7$ および $C_{max}/MIC \leq 3.1$ では菌の再増殖と耐性菌出現が確認されたことを報告しており¹⁶⁾, 今回のわれわれの検討結果を支持するものであった。

一方, *E. coli* における検討では, AUC/MIC が 47.3 以上および C_{max}/MIC が 5.6 以上の場合に LVFX 感受性低下菌の出現抑制が確認された。キノロン系抗菌薬の有効性および耐性菌発現抑制に関しては, *S. pneumoniae* 以外の菌種に対しても AUC/MIC および C_{max}/MIC が相関するとされているが, *E. coli* では *S. pneumoniae* と比較して詳細な検討報告が少ないのが現状である。その要因の一つに, *E. coli* が主要原因菌となる尿路感染症の薬効発現には, 抗菌薬の尿中濃度および血中濃度のいずれがより重

要であるかが明確となっていない点が挙げられる^{17,18)}。LVFX は、尿中では低 pH や金属イオンの影響を受け抗菌活性が低下するものの、尿中排泄型であるため尿中濃度は血中濃度の 100 倍以上となることから、有用な尿路感染症治療薬とされている。一方、尿中濃度は尿中の細菌を除去するうえでは重要となるが、腎組織感染や尿路性敗血症患者では尿中濃度より血中濃度のほうが有用なサロゲートマーカーとなるとの報告もある¹⁷⁾。グラム陰性菌を用いた *in vitro* シミュレーションモデルにおける検討はいずれも血中濃度を用いたものであるが、Madaras-Kelly らが CPFX および ofloxacin では、*Pseudomonas aeruginosa* に対する殺菌効果に必要な AUC/MIC は 100 と報告しており¹⁹⁾、Dudley らは CPFX と *P. aeruginosa* を用いた検討から、耐性化抑制には 8 以上の C_{max}/MIC が必要だとしている²⁰⁾。われわれの検討でも、*E. coli* では *S. pneumoniae* と比較して高いターゲット値が得られた。尿路感染症における AUC/MIC および C_{max}/MIC のターゲット値に関しては尿中濃度との関係も含めてさらに詳細な研究が必要であるが、臨床における検討結果からは尿路感染症治療には高用量のキノロン系抗菌薬を投与することが推奨されており²¹⁾、米国での尿路感染症の治療には LVFX 250 mg q.d. よりも 500 mg q.d. の処方数が多くなっている。

今回、*S. pneumoniae* で 100 mg t.i.d. 投与モデルで抗菌薬作用後に LVFX に対する感受性が低下したポピュレーションの耐性機序について解析した結果、抗菌薬作用前と比較して標的酵素の QRDR のアミノ酸の一変異、あるいはキノロン排出ポンプの発現亢進が確認された。前者に関しては、Fukuda らの研究においても LVFX の 100 mg t.i.d. 投与の *in vitro* シミュレーションで、一変異株が選択されることが報告されている²²⁾。一方、後者に関しては、*S. pneumoniae* では主に PmrA ポンプの存在が知られているが、それ以外にも reserpine で阻害を受けるポンプが存在することが報告されている²³⁾。PmrA ポンプは親水性の基質を排出しやすいため、LVFX より CPFX を良好な基質とする^{24,25)}。Louie らの報告では、*in vitro* シミュレーション実験において、CPFX を作用させた野生株からはポンプ高発現株が選択されたが、LVFX では選択されなかった²⁴⁾。しかしながら、ポンプ高発現株に CPFX あるいは LVFX を作用させた場合、CPFX だけでなく LVFX においてもポンプのさらなる発現亢進株が選択されており²⁴⁾、今回のわれわれの結果と一致するものであった。

E. coli に関しては、LVFX 100 mg t.i.d.、250 mg q.d.、250 mg b.i.d. および 500 mg q.d. 投与時の血中濃度を用いた検討を実施したが、AUC および C_{max} の低い 100 mg t.i.d.、250 mg q.d. および 250 mg b.i.d. では感受性低下ポピュレーションが出現した。100 mg t.i.d. および 250 mg q.d. 投与モデルで抗菌薬作用後に LVFX に対する感受性

が低下したポピュレーションの耐性機序について解析した結果、抗菌薬作用前と比較して標的酵素の QRDR のアミノ酸変異の蓄積、あるいはキノロン排出ポンプの発現亢進が確認された。*E. coli* では LVFX を用いた *in vitro* シミュレーションモデルにおける同様な検討報告はないが、キノロン系抗菌薬に対する耐性度は標的酵素の QRDR の遺伝子変異の蓄積および薬剤排出ポンプの発現により段階的に上昇することが報告されている^{26,27)}。*E. coli* におけるキノロン系抗菌薬耐性機構としては、これら以外にも外膜蛋白質や LPS の変異等が挙げられ²⁸⁾、*S. pneumoniae* と比較してより複雑な耐性機構の蓄積により LVFX の感受性低下ポピュレーションが出現すると考えられた。

本邦における 1996 年～2004 年の臨床分離 *S. pneumoniae* の LVFX 感受性率は 97.2～99.3% であり、LVFX は上市以来 10 年以上にわたり強い抗菌力を維持している^{1,4)}。しかしながら、海外では臨床分離株のなかで QRDR に一変異を有する株の比率は、LVFX の MIC が 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の菌株のなかで 30～71%²⁹⁻³¹⁾、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の菌株のなかで 6～25%^{30,31)} との報告もある。*S. pneumoniae* では、QRDR に一変異を有する株のほとんどは LVFX 感受性 (MIC $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$) であるが、一変異株では野生株と比較して自然耐性菌出現頻度が増加すると報告されている³²⁻³⁴⁾。一変異株にさらなる変異が入ると、*S. pneumoniae* では LVFX 耐性菌 (MIC $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$) となる^{32,33)}。一方、臨床分離株におけるキノロン排出ポンプ発現に関しては、Zhanel はカナダにおけるキノロン耐性臨床分離株 34 株中 12 株 (35.3%) がポンプ高発現株であったと報告している³⁵⁾。ポンプ変異株の場合も野生株と比較して自然耐性菌出現頻度が増加するとともに、QRDR の一変異株が選択されやすくなるとの報告もある²⁵⁾。事実、*S. pneumoniae* の一変異株では LVFX 500 mg q.d. においても *in vitro* シミュレーション実験において十分な殺菌効果が認められず、QRDR にさらなる変異を獲得した LVFX 耐性菌を選択することが報告されている³⁶⁻³⁸⁾。すなわち、一変異株あるいはポンプ高発現株を増やすことは将来における高度耐性菌の増加につながる可能性を示唆するものと考えられる。一方、今回の検討で示されたように、抗菌薬の用法・用量を PK/PD の観点から至適化することによって、このような低感受性ポピュレーションの出現を抑制することが可能と考えられた。

今回のわれわれの検討結果より、LVFX の 500 mg q.d. の投与方法は、100 mg t.i.d.、250 mg q.d. あるいは 250 mg b.i.d. と比較して、より効果的に将来の耐性化を抑制できる用法・用量である可能性が示唆された。抗菌薬の広汎な使用に伴い抗菌薬耐性菌が増加する一方で、新規抗菌薬の創出が困難な現況では、既存の抗菌薬を長期にわたり有効に使用していくことが必要であると考えられる。そのためにも、適切な投与方法を用いることが肝要であると考え

えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本試験の実施にあたりご協力いただきました渡辺里香氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Yamaguchi K, Ohno A, the Levofloxacin Surveillance Group: Investigation of the susceptibility trends in Japan to fluoroquinolones and other antimicrobial agents in a nationwide collection of clinical isolates: a longitudinal analysis from 1994 to 2002. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 135-43
- 2) 熊本悦明, 塚本泰司, 松川雅則, 国島康晴, 広瀬崇興, 茂田士郎, 他: 尿路感染症分離菌に対する経口ならびに注射用抗菌薬の抗菌力比較 (第 26 報 2004 年) その 1. 感受性について. *Jpn J Antibiot* 2006; 59: 177-200
- 3) 山口恵三, 古谷信彦, 岩田守弘, 渡邊直樹, 上原信之, 保嶋 実, 他: 呼吸器および尿路由来の臨床分離株に対する gatifloxacin の抗菌力 (2004 年度). *日本化学療法学会雑誌* 2005; 53: 627-40
- 4) 山口恵三, 大野 章, 石井良和, 館田一博, レボフロキサシンサーベイランスグループ: 2004 年に全国 77 施設から分離された臨床分離株 18,639 株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス. *Jpn J Antibiot* 2006; 59: 428-51
- 5) 横田伸一, 佐藤 清, 吉田 繁, 藤井暢弘: フルオロキノロン耐性 *Streptococcus pneumoniae* の検出状況と分子疫学的検討. *感染症学雑誌* 2004; 78: 428-34
- 6) Lacy M K, Lu W, Xu X, Tessier P R, Nicolau D P, Quintiliani R, et al: Pharmacodynamic comparisons of levofloxacin, ciprofloxacin, and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 672-7
- 7) Andes D, Craig W A: Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 261-8
- 8) Craig W A: Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1-12
- 9) Craig W A: Does dose matter? *Clin Infect Dis* 2001; 33 Suppl 3: S233-7
- 10) Madaras-Kelly K J, Demasters T A: *In vitro* characterization of fluoroquinolone concentration/MIC antimicrobial activity and resistance while simulating clinical pharmacokinetic of levofloxacin, ofloxacin, or ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 37: 253-60
- 11) Preston S L, Drusano G L, Berman A L, Fowler C L, Chow A T, Dornseif B, et al: Pharmacodynamics of levofloxacin. *J Am Med Assoc* 1998; 279: 125-9
- 12) Blaser J, Stone B B, Groner M C, Zinner S H: Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1054-60
- 13) Schubert S, Dalhoff A, Stass H, Ullmann U: Pharmacodynamics of moxifloxacin and levofloxacin simulating human serum and lung concentrations. *Infection* 2005; 33 Suppl 2: 15-21
- 14) Zhanel G G, Walters M, Laing N, Hoban D J: In vitro pharmacodynamic modelling simulating free serum concentrations of fluoroquinolones against multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 435-40
- 15) Lister P D, Sanders C C: Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrobiol Chemother* 1999; 43: 79-86
- 16) Coyle E A, Kaatz G W, Rybak M J: Activities of newer fluoroquinolones against ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1654-9
- 17) Fridomt-Møller N: Correlation between pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters and efficacy for antibiotics in the treatment of urinary tract infection. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 546-53
- 18) Wagenlehner F M, Weidner W, Naber K G: Emergence of antibiotic resistance amongst hospital-acquired urinary tract infections and pharmacokinetic/pharmacodynamic considerations. *J Hosp Infect* 2005; 60: 191-200
- 19) Madaras-Kelly K J, Ostergaard B E, Hovde L B, Rotzschauer J C: Twenty-four-hour area under the concentration-time curve/MIC ratio as a generic predictor of fluoroquinolone antimicrobial effect by using three strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 627-32
- 20) Dudley M N, Blaser J, Gilbert D, Mayer K H, Zinner S H: Combination therapy with ciprofloxacin plus azlocillin against *Pseudomonas aeruginosa*: effect of simultaneous versus staggered administration in an in vitro model of infection. *J Infect Dis* 1991; 164: 499-506
- 21) Carson C, Naber K G: Role of fluoroquinolones in the treatment of serious bacterial urinary tract infections. *Drugs* 2004; 64: 1359-73
- 22) Fukuda Y, Takahata M, Mitsuyama J: Pharmacodynamic evaluation of tosufloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro model simulating serum concentration. *J Infect Chemother* 2006; 12: 1-8
- 23) Piddock L J, Johnson M M, Simjee S, Pumbwe L: Expression of efflux pump gene *pmrA* in fluoroquinolone-resistant and -susceptible clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 808-12
- 24) Louie A, Brown D L, Liu W, Kulawy R W, Deziel M R, Drusano G L: In vitro infection model characterizing the effect of efflux pump inhibition on prevention of resistance to levofloxacin and ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3988-4000
- 25) Jumbe N L, Louie A, Miller M H, Liu W, Deziel M R, Tam V H, et al: Quinolone efflux pumps play a central role in emergence of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 310-7
- 26) Heisig P, Tschorny R: Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli*

- selected *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 1284-91
- 27) Cohen S P, Hooper D C, Wolfson J S, Souza K S, McMurry L M, Levy S B: Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 32: 1187-91
- 28) Chenia H Y, Pillay B, Pillay D: Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 1274-8
- 29) Canton R, Morosini M, Enright M C, Morrissey I: Worldwide incidence, molecular epidemiology and mutations implicated in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from the global PROTEKT surveillance programme. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 944-52
- 30) Lim S, Bast D, McGeer A, de Azavedo J, Low D E: Antimicrobial susceptibility breakpoints and first-step *parC* mutations in *Streptococcus pneumoniae*: redefining fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis 2003; 9: 833-7
- 31) Davies T A, Evangelista A, Pflieger S, Bush K, Sahm D F, Goldschmidt R: Prevalence of single mutations in topoisomerase type II genes among levofloxacin-susceptible clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated in the United States in 1992 to 1996 and 1999 to 2000. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 119-24
- 32) Jones M E, Sahm D F, Martin N, Scheuring S, Heisig P, Thornsberry C, et al: Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from Worldwide Surveillance Studies during the 1997-1998 respiratory season. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 462-6
- 33) Weigel L M, Anderson G J, Facklam R R, Tenover F C: Genetic analyses of mutations contributing to fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 3517-23
- 34) Okumura R, Hirata T, Onodera Y, Hoshino K, Otani T, Yamamoto T: Dual-targeting properties of 3-aminopyrrolidyl quinolones, DC-159 a and sitafloxacin, against DNA gyrase and topoisomerase IV: Contribution in reducing *in vitro* emergence of quinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2008; 62: 98-104
- 35) Zhanel G G, Walkty A, Nichol K, Smith H, Noreddin A, Hoban D J: Molecular characterization of fluoroquinolone resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates obtained from across Canada. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45: 63-7
- 36) Homma T, Hori T, Sugimori G, Yamano Y: Pharmacodynamic assessment based on mutant prevention concentrations of fluoroquinolones to prevent the emergence of resistant mutants of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 11: 3810-5
- 37) Schafer J, Hovde L B, Simonson D, Rotschafer J C: *In vitro* pharmacodynamics of moxifloxacin versus levofloxacin against 4 strains of *Streptococcus pneumoniae*: 1 wild type, 2 first-step *parC* mutants, and 1 pump mutant. Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 60: 155-61
- 38) Garrison M W, Schimmels J A, Madaras-Kelly K J: *In vitro* pharmacodynamic activity of gatifloxacin, gemifloxacin, moxifloxacin and levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* containing specific mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 47: 587-93

Evaluation of levofloxacin dosage regimens to prevent the appearance of resistant mutants in *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli* using an *in vitro* simulation model

Hiroko Kanda¹⁾, Megumi Chiba¹⁾, Kazue Inoue¹⁾, Kazuki Hoshino¹⁾,
Mayumi Tanaka²⁾, Tsuyoshi Otani¹⁾, Seiji Hori³⁾ and Kyoichi Totsuka⁴⁾

¹⁾ Biological Research Laboratories IV, Daiichi Sankyo Co., Ltd., 1-16-13 Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo, Japan

²⁾ Global Project Management Group, Daiichi Sankyo Co., Ltd.

³⁾ Department of Pharmacology, Jikei University School of Medicine

⁴⁾ Department of Infectious Diseases, Tokyo Women's Medical University

To determine levofloxacin (LVFX) dosage regimens for preventing the appearance of resistant mutants, we evaluated bactericidal activity and the emergence of resistant subpopulations in *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli* by simulating human blood concentration after receiving LVFX using an *in vitro* simulation model. We then evaluated AUC/MIC and C_{\max} /MIC ratios identified as pharmacodynamic predictors of clinical and microbiological outcomes and the appearance of bacterial resistance. For levofloxacin-susceptible strains (MIC $\leq 2 \mu\text{g/mL}$) of *S. pneumoniae* and *E. coli*, an AUC/MIC ratio of ≥ 35.8 and a C_{\max} /MIC ratio of ≥ 5.45 and an AUC/MIC ratio of ≥ 47.3 and a C_{\max} /MIC ratio of ≥ 5.6 , respectively, were needed to show potent bactericidal activities without the emergence of subpopulations with decreased susceptibility to LVFX. This means that the emergence of LVFX-resistant subpopulations was prevented in the model of LVFX 500 mg q.d. Subpopulations in which a susceptibility to LVFX decreased from 1/8 to 1/2 appeared in some strains where the MIC of LVFX was 1–2 $\mu\text{g/mL}$ after being treated with 100 mg t.i.d., 250 mg q.d. or 250 mg b.i.d. These subpopulations acquired one quinolone-resistance-associated amino acid substitution in the quinolone-resistance determining region of target enzymes or increased expression of the quinolone efflux pump. This suggested that LVFX 500 mg q.d. would be a more effective dosage regimen than 100 mg t.i.d., 250 mg q.d., and 250 mg b.i.d. to prevent the appearance of resistant mutants.